

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Influência do bloqueio do receptor do peptídeo liberador de
gastrina em combinação com inibição de histona deacetilase sobre
a proliferação de células de neuroblastoma**

Viviane Rösner de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, janeiro de 2011

A447i **Almeida, Viviane Rösner de**

Influência do bloqueio do receptor do peptídeo liberador de gastrina em combinação com inibição de histona deacetilase sobre a proliferação de células de neuroblastoma / Viviane Rösner de Almeida ; orient. Rafael Roesler. – 2011.

74 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Neuroblastoma 2. Receptores da bombesina 3. Inibidores de histona desacetilases 4. Epigênese genética 5. Peptídeo liberador de gastrina 6. Inibidores e antagonistas 7. Butiratos I. Roesler, Rafael II. Título.

NLM: QZ 380

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Agradecimentos..... | 03 |
| Dedicatória..... | 04 |
| Resumo..... | 05 |
| Introdução..... | 06 |
| Revisão da literatura..... | 08 |
| Neuroblastoma | 08 |
| Neuroblastoma e neurofinas | 10 |
| Aspectos genéticos em neuroblastoma..... | 11 |
| Terapias em neuroblastoma..... | 14 |
| Peptídeo liberador de gastrina (GRP)..... | 17 |
| Histonas deacetilases (HDACs)..... | 22 |
| Inibidores de histonas deacetilases (HDI): nova perspectiva terapêutica..... | 26 |
| Objetivos..... | 30 |
| Objetivo geral..... | 30 |
| Objetivos específicos..... | 30 |
| Referências da revisão da literatura..... | 31 |
| Artigo científico em inglês (Revista Cell Biology International)..... | 54 |
| Abstract..... | 56 |
| Introduction..... | 56 |
| Materials and Methods..... | 58 |
| Results..... | 61 |
| Discussion..... | 62 |
| Conclusions..... | 64 |
| Acknowledgments..... | 64 |
| References..... | 64 |
| Figure 1 and figure 2..... | 69 |
| Figure 3 | 70 |
| Considerações gerais..... | 71 |
| Anexo 1 – Artigo publicado (Cell Biology International) | 73 |

AGRADEÇO,

Ao Dr. Rafael Roesler, fonte inesgotável de conhecimento e profissionalismo.

A Dra. Ana Lucia Abujamra, uma grande amiga, brilhante pesquisadora e ajudou-me a
executar esse trabalho.

A Tatí Luft, por ter me inserido na pesquisa.

Aos meus pais Roni e Regina e a minha irmã Gabriela, por ser meu porto seguro em todas
as horas.

A todos os colegas, professores e colaboradores do Laboratório de Pesquisas em Câncer em
especial Amanda Pinhatti, Anna Laura Schmidt, Caroline Brunetto, Carolina Nör,
Débora Flores, Débora Prusch, Gabriele Zanirati, Gustavo Reolon, Lydiane Schmidt, Mari
Jaeger, Natasha Maurmann, Rafael Santos, Tiago Heinen.

Aos amigos e amigas, em especial ao Rodrigo.

Aos colegas do Colégio Anchieta.

Ao Instituto do Câncer Infantil (ICI/RS) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre
(HCPA), CNPQ Incentivo e pelo financiamento durante este trabalho.

DEDICO,

À minha família.

A todas crianças com câncer, para que baseadas na pesquisa tenham esperança nas terapias.

Aos pesquisadores na área, para que continuem nesse caminho de descobertas e aprendizado.

RESUMO

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) age como potente mitógeno em tecidos neoplásicos pela ativação do seu receptor (GRPR), que é super expresso em estágios avançados de neuroblastoma humano. GRPR knockdown ou antagonistas de GRPR mostraram inibir o crescimento de neuroblastoma.

Investigou-se, em condições experimentais, que os antagonistas de GRPR podem promover, em vez de inibir o crescimento de células de neuroblastoma. O antagonista do GRPR, RC-3095 em 0,1 nM inibiu, enquanto a concentração de 100 nM estimulou a proliferação de células de neuroblastoma murino Neuro2a, *in vitro*. Os efeitos proliferativos de RC -3095 no crescimento celular foram impedidos pelo inibidor de deacetilase de histona (HDI), butirato sódico (NAB).

Estes resultados fornecem a primeira evidência de que um antagonista do GRPR pode estimular o crescimento de células cancerosas, e sugerem que o GRPR pode interagir com os mecanismos epigenéticos na regulação do crescimento de células do neuroblastoma.

Palavras-chave: RC-3095, receptor do peptídeo liberador de gastrina, butirato sódico, inibidores de deacetilase de histona, mecanismos epigenéticos, neuroblastoma.

INTRODUÇÃO

O neuroblastoma é o tumor sólido extracranial mais comum em crianças, representando 9-10% dos cânceres pediátricos. Origina-se de células da crista neural associadas ao sistema nervoso parassimpático. É marcado pela sua heterogeneidade, e parte dos tumores tende a regredir espontaneamente ou progredir rapidamente. Seu desenvolvimento depende da sinalização do complexo de neurotrofinas (fator de crescimento neuronal, fator neurotrófico derivado do cérebro e neurotrofina 3) com seus receptores tirosina cinase (TrkA, TrkB, TrkC, respectivamente).

As características genéticas como status de ploidia, ampliações de oncogenes ou perda alélica tem sido correlacionadas em investigações clínicas de neuroblastoma. Além disso, há uma forte associação entre TrkB e a amplificação de MYCN na indução de sobrevivência celular.

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) é um mitógeno e a super expressão de seu receptor (GRPR) na superfície celular pode estar associada com o comportamento mais agressivo e baixo prognóstico em linhagens celulares. RC-3095 é o antagonista de GRPR, o qual apresenta favorável toxicidade e atividade antitumoral em modelos pré-clínicos.

Mecanismos ocorrentes após a tradução de genes são chamados de epigenéticos. A interação entre o DNA e proteínas histonas controla a ativação ou repressão da transcrição de genes. Em câncer, diversas vias de sinalização intracelular estão relacionadas com histonas deacetilases (HDAC) e histonas acetilases (HAT). O desequilíbrio provocado pela acetilação e deacetilação de histonas está presente em diversos tipos de neoplasias.

Em neuroblastoma apesar de a sobrevida global ser menos de 40% mesmo com uma terapia intensiva multimodal, moduladores epigenéticos estão sendo associados a terapias padrão, pois o tratamento com inibidores de histonas deacetilases oferecerá melhor acesso dos agentes citotóxicos ao DNA.

REVISÃO DA LITERATURA

NEUROBLASTOMA

Neuroblastoma é o tumor sólido extracranial pediátrico mais comum em crianças, para o qual o prognóstico é variável e amplamente dependente da biologia do tumor (Brouder GM, 2003; Maris JM et al, 2007). Representa 9-10% dos tumores pediátricos e permanece altamente letal apesar de seu tratamento agressivo, com taxa de mortalidade excedendo 50% (Castel V et al, 2007). Origina-se de uma linhagem simpaticoadrenal da crista neural e, por isso, os tumores podem desenvolver em qualquer lugar do sistema nervoso simpático. A maioria dos tumores (65%) ocorre dentro do abdômen, com até metade desses surgindo na medula adrenal. Aproximadamente metade dos pacientes apresenta evidências de metástases hematológicas (Maris JM et al, 2007).

A sobrevivência de crianças em estágios avançados da doença permanece abaixo com significativa morbidade em longo prazo - a alta morbidade deve-se do recebimento de dose intensivas de terapia em uma idade jovem. Ao contrário de neoplasias sólidas adultas que geralmente surgem em tecidos totalmente diferenciados, neuroblastoma e outras neoplasias embrionárias surgem durante o desenvolvimento normal de tecidos (Shusterman S. & Maris JM, 2005).

A clínica de neuroblastoma é marcada pela heterogeneidade, com probabilidade de cura variando amplamente de acordo com a idade ao diagnóstico, extensão da doença e a biologia do tumor. Um subconjunto de tumores passará por regressão espontânea enquanto outros mostrarão severa progressão. Aproximadamente metade de todos os casos atualmente é classificada como alto

risco por recidiva da doença, com taxa de sobrevida global menos de 40% apesar da terapia intensiva multimodal.

A categorização de neuroblastomas é determinada pelo grau de diferenciação celular do tumor. Os tumores pouco diferenciados, com neuroblastos abundantes são classificados como neuroblastomas, enquanto tumores benignos bem diferenciados com células ganglionares maduras e neuroblastos esparsos são descritos como ganglioneuromas (Hicks MJ et al., 1995). Ganglioneuroblastomas é uma categoria intermediária possuindo características de ambos, os neuroblastomas imaturos e ganglioneuromas diferenciados (Peuchmaur M. et al., 2003). Esses tumores regredem espontaneamente, particularmente em crianças, ou maturam em ganglioneurônios benignos (Brouder GM, 2003).

Os sintomas mais comuns de neuroblastoma são: dor (frequência de ocorrência de 34%), febre (28%) e perda peso (21%); os sintomas dependem da massa do tumor e da extensão de metástases. Alguns neuroblastomas são assintomáticos e detectados acidentalmente. No entanto, existem alguns sintomas raros característicos e.g. paralisia dos membros inferiores devido à extensão de um tumor primário (4%); diarreia severa refratária ao tratamento padrão, devido à produção de peptídeo intestinal vasoativo (VIP) pelas células tumorais (4%); encefalopatia cerebelar aguda, caracterizada por ataxia cerebelar (2,8%); síndrome de Horner, freqüentemente presente em pacientes com lesões nos gânglios simpáticos da coluna cervical ou torácica superior (1,7%); hipertensão arterial, rubor e períodos de excessiva sudorese, ocasionalmente, causado pelo aumento as concentrações de catecolaminas (0,2%) (Schwab M et al, 2003).

Tumores favoráveis (benignos) são caracterizados por cariótipos quase triploides com ganho completo em cromossomos. Esses tumores raramente têm

rearranjos estruturais e geralmente expressam o receptor de neurotrofina, TrkA. Pacientes com esses tumores incidem mais frequentemente crianças com menos de um ano de idade, são tumores localizados e com bom prognóstico (Brouder GM, 2003).

Tumores desfavoráveis (malignos) são caracterizados por mudanças estruturais, incluindo deleções de 1p ou 11q, ganho desbalanceado de 17q e/ou amplificação do protooncogene MYCN. Podem também expressar o receptor de neurotrofina, TrkB e seu ligante, BDNF. Esses pacientes têm geralmente idade acima de um ano, estágios de doença mais avançado e pior prognóstico, necessitando de tratamento agressivo (Brouder GM, 2003).

NEUROBLASTOMA E NEUTROFINAS

O desenvolvimento de células originadas do sistema nervoso simpático parcialmente depende de complexos neurotróficos. Os receptores de neurotrofinas (NTRK1, NTRK2, NTRK3, codificantes de TrkA, TrkB, TrkC, respectivamente) e seus ligantes (NGF, BDNF e neurotrofina-3, respectivamente) são importantes reguladores de sobrevivência, crescimento e diferenciação de células neuronais (Nakagawara A., 2001). A alta expressão de TrkA está presente em neuroblastomas com prognóstico favorável, que frequentemente regredem espontaneamente (Nakagawara A et al., 1992; Nakagawara A. et al.,1993; Suzuki E. et al.,1993; Kogner P. et al.,1993). A sinalização de NGF/TrkA provoca diferenciação ou regressão no microambiente de neuroblastomas favoráveis. Mais recentemente, uma variante oncogênica de TrkA (TrkAIII) foi identificada por antagonizar a sinalização anti-oncogênica NGF/TrkA e promover crescimento tumoral (Tacconelli

A. et al., 2004). TrkB é comumente expresso em neuroblastomas biologicamente desfavoráveis. Embora uma isoforma truncada sem o domínio catalítico de tirosina cinase estaria expressa em tumores favoráveis, TrkB em seu comprimento total é expresso com seu ligante, BDNF, predominantemente em tumores com amplificação MYCN (Nakagawara A. et al., 1994). A co-expressão pode incluir uma sinalização de sobrevivência autócrina ou parácrina que promove resistência quimioterápica e metástases através de anoikis (Nakagawara A. et al., 1994; Douma S. et al., 2004).

O TrkC é expresso em neuroblastomas em níveis variáveis, mas seu ligante preferencial, neurotrofina 3, é quase indetectável em neuroblastomas primários (Yamashiro D.J. et al., 1997).

ASPECTOS GENÉTICOS EM NEUROBLASTOMA

As mudanças genéticas específicas que têm sido identificadas nos permitem classificar os tumores em subconjuntos com características biológicas e comportamento clínico. De fato, certas anormalidades genéticas são poderosas preditoras de resposta à terapia, e desta maneira, tornam-se componentes essenciais na caracterização do tumor no diagnóstico. Assim, neuroblastoma serve como um modelo de tumor sólido em que as análises genéticas e biológicas das células tumorais fornecem informações importantes que guiam o manejo dos pacientes (Brouder GM, 2003).

Os genes tumorais mais comumente alterados na carcinogênese de adultos (TP53, CDKN2A, Ras) são raramente aberrantes em neuroblastoma, com exceção de MYCN.

Muitas características genéticas como status de ploidia, ampliações de

oncogenes ou perda alélica tem sido correlacionados com os resultados clínicos. O conteúdo de DNA em neuroblastoma se divide em duas grandes categorias: quase diploide ou hiperploide (quase triploide). Modelos genéticos em neuroblastoma sugerem que tumores menos agressivos têm um defeito fundamental em mitose associada com o ganho e perda no cromossomo, o qual poderia explicar porque um tumor quase triploide parece ser favorável. Reciprocamente, neuroblastomas mais malignos tem um defeito fundamental na estabilidade genômica, resultando em rearranjos cromossomais, translocações desbalanceadas e manutenção do conteúdo de DNA quase diploide (Brouder GM, 2003). A amplificação é uma das principais vias moleculares na qual o potencial oncogênico de protooncogenes é ativado durante a tumorigênese. Deleções alélicas em neuroblastoma são comumente causadas pela perda de heterozigosidade (LOH) das diferentes regiões do 1p (Schwab M. et al., 1996). Aproximadamente 2/3 de neuroblastomas de estágio avançado tem conteúdo diploide de DNA e são frequentemente quimiorresistente. (Look A.T. et al., 1984). A aberração genética mais consistentemente associada com baixo resultado em neuroblastoma é a amplificação de MYCN, esta ocorre em aproximadamente 20% dos tumores primários e está fortemente correlacionada com estágio avançado da doença e falha no tratamento (Brouder GM et al., 1984). O protooncogene MYCN forma um heterodímero com MAX e este complexo protéico funciona como um ativador transcricional. Na ausência de MYCN (ou MYC), MAX forma um homodímero que é transcricionalmente repressivo. A expressão de MYCN evoca potentes pontos de checagem que agem como barreiras para tumorigênese de modo que neuroblastos com essa amplificação podem contornar sua seleção pela perda de reguladores chave de pontos de checagem, conduzindo a um fenótipo altamente maligno (Goldsmith K.C. & Hogarty M.D., 2005; Nilsson J.A. et al., 2005).

Apenas poucos alvos de MYCN são conhecidos, por exemplo, ornitina descarboxilase (ODC), proteínas de manutenção (MCM7) e proteínas resistentes a multidrogas (MRP1) (Norris M.D. et al., 1997; Shohet J.M. et al., 2002), mas a ativação desses genes conduz para a progressão através da fase G1 do ciclo celular. Embora MYCN tenha uma meia-vida curta, os altos níveis de estado de equilíbrio (aproximadamente 100 vezes maior que células normais) amplificados em células tumorais provavelmente asseguram que as células permaneçam no ciclo e não entrem G0 (Nakagawara A. et al., 1992).

Deleções do braço curto do cromossomo um (1p) podem ser identificadas em 25-35% de neuroblastomas. Essas deleções correlacionam-se não só com a amplificação de MYCN, mas também com estágios avançados da doença (White P.S. et al. 1995; Martinsson T. et al., 1995; White P.S. et al. 2001; White P.S. et al., 2005). Entretanto, os genes presentes no cromossomo 1p envolvidos na patogênese de neuroblastoma não têm sido identificados apesar de intensivas investigações. Evidências sugerem que a perda alélica de 1p36 prediz aumento ao risco ou recidiva em pacientes com tumores localizados (Gehring M. et al., 1995; Caron H. et al., 1996; Maris J.M. et al., 2002; Spitz R. et al., 2002).

A perda alélica de 11q está presente em 35-45% de tumores primários (Guo C. et al., 1999; Spitz R. et al., 2003). Um ganho adicional de 1-3 cópias no cromossomo 17q, frequentemente através de uma translocação desbalanceada com cromossomo 1 ou 11, pode também estar correlacionado com um fenótipo mais agressivo (Bown N. et al., 1999).

O histórico familiar de neuroblastoma é identificado em 1-2% dos casos (Maris, J.M. & Tonini, G.P., 2000; Shojaei-Brosseau T. et al., 2004), é uma herança

autossomal dominante com penetrância incompleta. A média de idade do diagnóstico de pacientes com neuroblastoma de origem familiar é de nove meses, os quais contrastam com a média de idade de aproximadamente 18 meses na população em geral. Até 20% dos pacientes com neuroblastoma de origem familiar tem tumores primários multifocais ou tumores bilaterais adrenais (Kushner B.H. et al., 1986; Maris J.M. & Matthay K.K., 1999).

Análises genéticas tradicionais tem identificado no braço curto do cromossomo 16p, uma provável predisposição, embora nenhum gene causal foi identificado (Maris J.M. et al, 2002). A predisposição é geneticamente heterogênea e a iniciação de tumorigênese necessitaria de múltiplas alterações.

TERAPIAS EM NEUROBLASTOMA

Os métodos de tratamento usados nos pacientes portadores de neuroblastoma incluem cirurgia, quimioterapia, radioterapia. Os principais alvos da intervenção cirúrgica são: a completa ressecção do tumor, estadiamento por exame e biópsia de estágio avançado da doença. A radioterapia tem se mostrado bem sucedida na diminuição da taxa de recidiva local de neuroblastoma de alto risco. Essa também tem sido utilizada conjuntamente com a quimioterapia, a fim de melhorar a ressecabilidade da doença em estágio avançado.

Muitos pesquisadores sugerem um potencial mecanismo imunológico de regulamentação tumoral para explicar a regressão espontânea do tumor. O conceito de células imunológicas "programadas" contra antígenos em células tumorais tem recebido grande interesse pela comunidade científica. Os retinóides mostraram-se modular a principal via da classe de histocompatibilidade I, através da apresentação

de linfócitos citotóxicos (Vertuani S. et al., 2003).

Quase metade de todos os pacientes com neuroblastoma apresenta disseminação da doença no diagnóstico. A maioria dos pacientes com estágio 4S de doença (crianças abaixo de um ano de idade com hiperploídia, histologia favorável, tumores com apenas uma cópia de MYCN) dividem-se na categoria de baixo risco com uma probabilidade de 85% a 92% na sobrevida global. Entretanto pacientes diagnosticados nos primeiros dois meses de vida parecem vulneráveis para o comprometimento respiratório e uma progressiva hepatomegalia (Katzenstein H.M. et al., 1998; Nickerson H.J. et al., 2000).

Nas últimas duas décadas, tentativas tem sido feitas para melhorar resultados em pacientes com alto risco através da indução de terapia intensiva. Comumente, agentes usados incluem cisplatina, etoposídeo, doxorubicina, ciclofosfamida e vincristina (Cheung N.K. et al., 2001). A combinação de topotecan e ciclofosfamida tem sido usada na recidiva por mais de uma década, e recentes estudos piloto tem mostrado viabilidade de integração desta combinação em um regime de indução agressivo (Park J. et al., 2006). Inibidores de topoisomerase 1 e irinotecano são frequentemente utilizados no início da recidiva por causa de sua eficácia e seu perfil de toxicidade tolerável (Wagner L.M. et al., 2004; Vassal G. et al., 2003; Saylor R.L. et al., 2001; Längler A. et al., 2002). A eficácia de topotecano é intensificada quando combinada com baixas doses de ciclofosfamida (London W.B. et al. 2010). A combinação de irinotecano e temozolamida é bem tolerada e a eficácia está sendo estudada.

CEP-701, uma pequena molécula inibidora de tirosina cinase (Trk), tem mostrado ter um efeito substancial de inibição de crescimento em neuroblastoma *in vivo* (Evans A.E. et al., 2001; Evans A.E. et al., 1999) e ensaios clínicos de fase I

estão em andamento. Outros inibidores de tirosina cinase, incluindo inibidores do receptor do fator de crescimento epidermal, podem ter atividade contra neuroblastoma (Ho R et al., 2005) e estão entrando em ensaios clínicos. Imatinibe mesilato tem sido estudado em neuroblastoma porque alguns tumores parecem expressar c-kit, PDGFR (Beppu K. et al. 2004).

Vários novos agentes, especialmente alvos únicos de neuroblastoma podem ser efetivos para eliminar a doença residual. Os retinóides são componentes de uma classe conhecida por induzir diferenciação terminal de células de neuroblastoma *in vitro* (Sidell N., 1982; Garattini E. et al., 2007). Na conclusão do tratamento, catecolaminas urinárias e estudos de imagem podem ser usados para monitorar a recorrência tumoral.

O silenciamento epigenético de genes que são cruciais para indução de morte celular programada, assim como caspase-8, parece ocorrer frequentemente em neuroblastoma (Teitz T. et al., 2000). Além disso, agentes desmetilantes, como decitabina são atualmente estudados. Inibidores de histonas deacetilases tem também mostrado atividade pré-clínica contra neuroblastoma (Jaboin J. et al., 2002; Coffey D.C. et al., 2001). Até três inibidores de histonas deacetilases estão atualmente em ensaios clínicos para pacientes refratários portadores de tumores sólidos. Inibidores de proteínas de choque térmico 90 (HSP90) estão em evidência por causarem alteração na função de moléculas associadas com o crescimento celular de neuroblastoma e proliferação, incluindo o receptor do fator de crescimento de insulina tipo I, AKT e TrkB (Bagatell R. et al., 2005; Yang Z.F. et al., 2005). Como a expansão de novas drogas está aumentando, a importância de segurança biológica e a evidência de eficácia em modelos pré-clínicos ajuda a priorizar o desenvolvimento de drogas.

PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA (GRP) E SEU RECEPTOR (GRPR)

Receptores de fatores de crescimento estão envolvidos em todos os passos da progressão tumoral, angiogênese, invasão local e metástases. Além disso, a superexpressão de receptores de fatores de crescimento na superfície celular em células neoplásicas pode estar associada com o comportamento mais agressivo e prognóstico baixo (Perona R., 2006; Flores D.G., 2008).

Os receptores de proteína G-acoplados são caracterizados por sete domínios alfa-hélices transmembrânicos, representantes da superfamília de receptores transmembranas mais ampla no genoma de humanos, *C. elegans*, camundongos e *Drosophila*.

O peptídeo liberador de gastrina (GRP), presente em mamíferos, é um homólogo do peptídeo encontrado em anfíbios chamado bombesina (BB), este é um dos maiores fatores de crescimento em vários tipos de câncer humano. O receptor (GRPR) é super expresso em diferentes neoplasias e sua ativação estimula o crescimento tumoral (Oliveira M.S. et al., 2009).

BB é um dos peptídeos biologicamente purificado da pele de um anfíbio, descoberto em 1971 por Anastaci e colegas (Anastaci A. et al., 1971). O primeiro peptídeo em mamíferos semelhante a BB foi isolado do tecido gástrico de porco e nomeado peptídeo liberador de gastrina, devido sua potente ação na liberação de gastrina (Mcdonald et al., 1979). Além disso, em 1983 um novo peptídeo semelhante à bombesina foi identificado na coluna vertebral de porcos e nomeado neuromedina B (NMB). BB é um peptídeo de 14 aminoácidos, enquanto GRP e NMB contem 27 a 32 resíduos de aminoácidos em suas formas maduras, respectivamente (Cornelio D.

B. et al., 2007; Flores D.G. et al., 2009; Jensen R.T. et al. 2008).

GRP e BB dividem uma sequência altamente conservada de 7 aminoácidos, a qual é requerida para imunogeneticidade e alta afinidade pelo seu ligante, o receptor de GRP (GRPR) (Chu K.U. et al., 1995).

GRPR medeia uma variedade de respostas celulares, incluindo modulação da contração de músculos lisos, secreção de ácido gástrico, secreção de enzimas pancreáticas, regulação da temperatura corporal, estimulação de crescimento celular. GRP também serve como neurotransmissor no sistema nervoso central e processos inflamatórios (Rozengurt E. & Sinnett-Smith J., 1983; Cornelio D.B. et al., 2007, Oliveira P.G. et al., 2008).

O antagonista de GRPR tem sido desenvolvido como um composto anticâncer, exibindo expressiva atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em tumores murinos e humanos (Kahan Z. et al., 2000; Bajo A.M. et al., 2004; Stangelberger A. et al., 2005; Cornelio D.B. et al., 2007; de Farias C.B. et al., 2009). Particularmente, a inibição de GRPR demonstrou-se interferir com outras sinalizações de fatores de crescimento relevantes como EGF e VEGF (Plonowski A. et al., 2000; Szepeshazi K. et al., 1999; Cornelio D.B. et al., 2007). As recentes observações, que GRP estimula a angiogênese e que o antagonista de GRP bloqueia o crescimento tumoral, apresentam novas opções terapêuticas (Martinez E. Z. et al., 2005). RC-3095 é um antagonista de GRPR, o qual mostrou-se com um perfil de toxicidade favorável e atividade antitumoral em modelos pré-clínicos.

Os receptores de GRP se ligam a uma proteína Gαq (Gq) ativando a fosfolipase C-β (PLC- β) que cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), resultando na produção de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) elevando os níveis de cálcio intracelular, e deste modo, ativando cascatas de proteínas cinases (MEK,

ERK) que podem levar à liberação de cromogranina-A (CGA), um marcador tumoral, para o meio extracelular (Roesler R. et al., 2006a; Roesler R. et al., 2006b; Roesler R. et al., 2004). Todos os receptores GRP caracterizados até o momento são proteínas de ligação ao nucleotídeo guanina (proteína G) acoplada, que tem sete domínios transmembrana, e ativa a fosfolipase C aumentando as concentrações intracelulares de fosfatos de inositol, diacilglicerol e cálcio (Rozengurt E., 1998). Outros mediadores intracelulares ativados por receptores de GRP incluem proteínas ativadas por mitógenos, cinase de adesão focal, fosfatidilinositol 3-cinase e em algumas situações, resposta AMP cíclico (Farias C.B. et al., 2008; Patel O. et al., 2004; Rozengurt E., 2002; Qu X. et al., 2002).

Observa-se, a nível molecular, que p53 e o alvo downstream de p21 são super expressos pelo GRP knockdown, levando a uma diminuição da ativação do regulador da proliferação celular, ERK. O silenciamento de GRP promove apoptose em células de neuroblastoma e melhora os efeitos citotóxicos de quimioterápicos pela ativação da morte celular mediada por mecanismos de sinalização de p53 (Paul P. et al. 2010).

A estimulação de bombesina/GRP ativa a adenilato ciclase, levando a um aumento intracelular de adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPC), que estimula a expressão de c-fos e c-myc e promove a mitogênese em células de Swiss 3T3 (Benya R.V. et al., 1994) .

O sistema de GRPR parece ter uma interação funcional com neurotransmissores e outros sistemas de receptores (GABA, dopamina e receptores de glicocorticóides) implicados na patogênese da esquizofrenia, doença de Parkinson, e na mediação da ansiedade e respostas ao estresse. Além disso, recentes evidências indicam que medicamentos que agem no GRPR devem ser

instrumentos potenciais para o tratamento da disfunção de memória associada à doença de Alzheimer (Roesler R. et al., 2006b). GRP também tem sido implicado nos processos de inflamação (Cornelio D. B. et al., 2007).

Bombesina estimula precocemente os mecanismos de transdução de sinal em linhagens celulares humanas de câncer de mama MCF-7 (Patel K.V. et al., 1990). O efeito trófico sobre o crescimento celular foi estabelecido na mucosa intestinal normal (Chu K.U. et al., 1995) e no pâncreas (Parekh D. et al., 1994), bem como em pulmão (Alexander R.W. et al., 1988), estômago (Bold R.J. et al., 1998; Kim H.J. et al., 1996), cólon (Narayan S. et al., 1990), mama (Burns D.M. et al., 1999) e próstata (Bologna M. et al., 1989; . Logothetis C. et al., 1992).

Os antagonistas sintéticos são produzidos para ligar-se com alta afinidade aos receptores, bloqueando as vias de sinalização. Muitos antagonistas do GRP foram sintetizados e testados. Schally et al. realizaram vários estudos com o RC-3095 e RC-3940-II. Eles demonstraram que os antagonistas do GRP inibem o crescimento do andrógeno-independente da linhagem de celular de câncer de próstata PC-3, in vivo, exercendo, possivelmente, um efeito inibitório direto no crescimento do tumor através de uma regulação dos receptores EGF (Jungwirth A. et al., 1997).

O estudo de fase I, recentemente realizado em nossa instituição determinou a segurança e a viabilidade na administração subcutânea de RC-3095 em 25 pacientes com tumores sólidos avançados (Schwartzmann G. et al., 2006). As doses foram administradas uma vez ou duas vezes por dia, variando de 8 a 96 µg/kg. A toxicidade observada foi apenas um desconforto no local da injeção em doses maiores. A administração de uma dose única de RC-3095 em sua maior concentração (96 µg/kg) foi testada em um indivíduo hipergastrinêmico com a

síndrome de Zollinger-Ellison e produziu uma diminuição de gastrina plasmática abaixo de 50% dos níveis basais em 6 h (Cornelio D. B. et al.,2007).

O GRP age como um fator de crescimento autócrino para neuroblastomas (Kahan Z. Et al.,2000). Em um estudo realizado, o tratamento com GRP induziu a fosforilação mediada por PI3K da GSK-3 β e a inibição resultante, levou ao acúmulo nuclear de ciclina D, que promove a progressão do ciclo celular (Chu K.U. et al., 1995). A via PI3K/Akt mostrou-se ser importante na regulação da transcrição e tradução do gene da ciclina D (Chu K.U. et al., 1995). A fosforilação de Akt pelos inibidores de cinase dependentes de ciclina, p21 e p27 induz também a progressão da fase G1 / S. Uma vez fosforilados, p21 e p27 são translocados e levadas ao citoplasma; p27 também pode sofrer proteólise pela estimulação indireta de Akt (Chu K.U. et al., 1995; Rajpal S. & Venuk A.P., 2006). O RNA mensageiro de GRPR está presente em linhagens celulares de neuroblastoma e o tratamento com GRP estimulou o crescimento de linhagens celulares humanas *in vitro*. Este efeito foi inibido em células SK-N-SH pelo pré-tratamento com o anticorpo GRP. Šebesta et al. analisaram 19 amostras de neuroblastomas humanos ressecados, com a intenção de relacionar a expressão com GRP e outros indicadores conhecidos de pior prognóstico. GRP e GRPR estavam qualitativamente presentes em todas as amostras, independentemente da idade do paciente ou do estágio da doença. (Cornelio D. B. et al., 2007; Gustafson W. C. et al., 2005).

GRP ativa a produção de cálcio através do sistema de segundo mensageiro em células de neuroblastoma, a qual foi bloqueada pelo tratamento prévio com BIM26226 (antagonista GRP-R específico) (Kim S. et al., 2002). No entanto, algumas linhagens de células de neuroblastoma não responderam completamente ou falharam ao mostrar o aumento intracelular de Ca²⁺ mediante ao tratamento de

GRP. Isso implica que os sinais de outras possíveis rotas provêm de transdução e podem estar envolvidas na resposta de estimulação com GRP (Gustafson W. C. et al., 2005). Uma possibilidade para proliferação de células não mediada por Ca^{2+} pode ser a comunicação cruzada entre as vias classicamente vinculadas para outros receptores, como o Ras/Raf/proteína ativada por mitógeno cinase (MAPK) ou fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K)/via sinalização de Akt, conhecida por estimular a proliferação celular em outros sistemas (Gustafson W. C. et al., 2005).

HISTONAS DEACETILASES (HDAC)

A cromatina presente no núcleo de células eucarióticas sofre modificações em sua estrutura e a composição química. Posteriormente, com a diferenciação das células essas modificações conduzem a diversos padrões de expressão genética e diferenças na função celular (Duncan E.M. et al., 2008). Tais modificações pós-traducionais são chamadas de processos epigenéticos e mudanças na expressão gênica são herdadas, sem alteração da sequência de nucleotídeos (Glaser K.B., 2007). Essas modificações na cromatina, incluindo DNA e histonas ou outras proteínas associadas a cromatina compreendem a metilação, acetilação, fosforilação ou a ligação de ubiquitina (Zheng Y.G. et al., 2008; Strietholt S. et al., 2008). Modulações epigenéticas são importantes para a compreensão da regulação de informações genéticas (Marmorstein R.,2001; Khan N. et al., 2008; Ocker M. & Schneider-Stock R., 2007; Porcu M. & Chiarugi A., 2005). Mecanismos epigenéticos, incluindo acetilação e deacetilação das histonas, fornecem controle adicional na expressão de genes em nível da cromatina (Minucci S. & Pelicci G., 2006; Stimson L. & Thangue N.B. La, 2009; Finnin M.S. et al., 1999).

A organização da cromatina é crucial para a regulação da expressão gênica. Em particular, porque o posicionamento e as propriedades dos nucleossomos influenciam na transcrição específica em resposta a sinais extracelulares e intracelulares (Kouraklis, G & Theocharis, S, 2002).

Histonas estão entre as proteínas mais conservadas evolutivamente e mais abundantes no DNA em células eucarióticas. As interações entre o DNA e as caudas N-terminais das histonas controlam a ativação ou repressão da transcrição de genes, além disso, diversas modificações químicas podem alterar o status de histonas na transcrição gênica. Desordens na acetilação podem ser devido à hiperacetilação e concomitante derepressão de promotores normalmente reprimidos, conduzindo a presença de um conjunto de proteínas inapropriadas. (Kouraklis, G & Theocharis, S, 2006).

A acetilação, adição do resíduo acetil nas caudas N-terminais dos aminoácidos de lisina das histonas, está em equilíbrio devido à presença de duas enzimas: as histonas acetiltransferases (HAT) e as histonas deacetilases (HDAC). Genes que codificam enzimas HAT são translocados ou amplificados, super expressos ou mutados em diferentes tipos de câncer (Kouraklis, G & Theocharis, S, 2006).

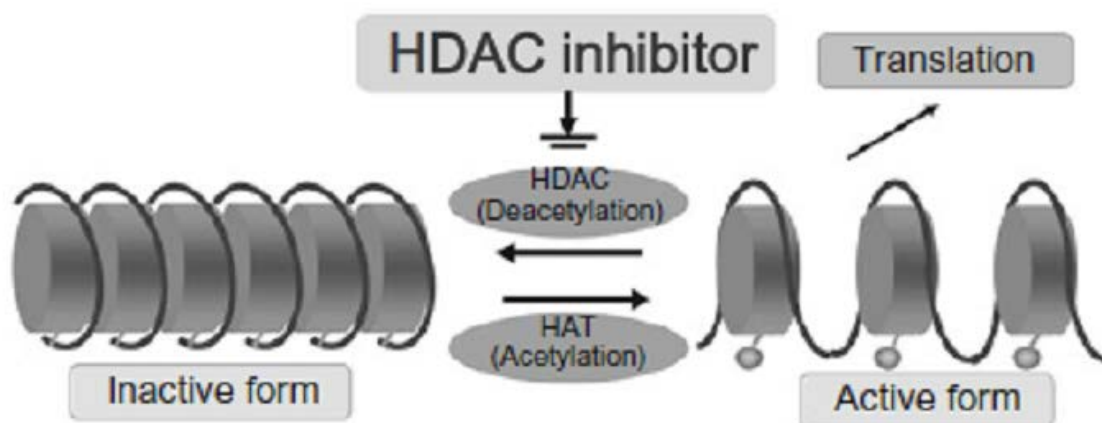


Fig. 1: A regulação da expressão gênica por histona deacetilase (HDAC) e histona acetiltransferase (HAT). Na estrutura da cromatina, o DNA (curva espiral) é envolvido pela histona (cilindro).

Estes compostos pertencem a uma família de pequenas moléculas promissoras baseada em terapias anti-câncer (Bertrand P., 2010).

A acetilação induz a uma abertura na estrutura da cromatina e acentua a capacidade da proteína ao interagir com o DNA e outras estruturas protéicas. Esta conformação aberta permite aos fatores de transcrição o acesso a seus promotores, facilitando o processo de expressão gênica (forma ativa) (Hoshino I. & Matsubara H., 2010). Esse relaxamento pode ser revertido pela atividade de HDAC (forma inativa) (Bertrand P., 2010).

O excesso no nível de deacetilação aumenta a densidade de carga sobre as caudas N-terminais das histonas, fortalecendo assim a interação da ligação entre histona e DNA (Ellis L. et al., 2008). Há associação de histonas a patologias, e.g. câncer, por promoverem a repressão de genes na regulação dos tumores, especificamente, com o *downregulation* de genes pró-apoptóticos, especialmente em células tumorais (Enokida H. & Nakagawa M., 2008; Kanao K. et AL., 2008). A atividade de inibidores de HDAC (HDIs) resultou em um aumento do nível de acetilação em histonas, promovendo, por sua vez a re-expressão de genes regulatórios silenciados.

Além disso, uma série de proteínas citoplasmáticas, incluindo tubulina e HSP90, já demonstraram ser acetilados por HDAC (Budillon A. et al., 2007; Fiskus W. et al., 2008; Fiskus W. et al., 2007; Catalano M.G. et al., 2007; Simms-Waldrup T.

et al., 2008). Portanto, HDACs não só modulam a estrutura e dinâmica da cromatina, mas também desempenham um papel fundamental na regulação de outros processos celulares como motilidade celular, endocitose e sinalização do receptor de membrana (Walkinshaw D.R. & Yang X.J.,2008).

Há evidências que sugerem que a atividade alterada de HDAC pode desempenhar um papel determinante tanto em tumorigênese quanto na metástase (Glozak M.A. & Seto E.,2007), através das seguintes atividades:

- Hipoacetilação de histona: característica da maioria dos cânceres (Bhaumik S.R. et al., 2007).
- Em leucemias, HDACs apresentam expressão, freqüentemente, aberrante para promotores de expressão gênica de proteínas derivadas da fusão em translocações cromossômicas (Lin R.J. et al., 2001; Minucci S & Pelicci P.G.,2006).
- A superexpressão de HDACs específica ocorre em vários tipos de câncer, e o crescimento de linhagens celulares derivados destes tumores é reprimida por pequenos *knockdown* de RNA interferência (siRNA) mediada pela super expressão de HDAC (Bolden J.E. et al., 2006).
- A expressão de HDACs pode bloquear a função dos genes supressores de tumor, como p53 (Tang Y. et al., 2008).
- Além de afetar a estrutura da cromatina e a expressão dos genes que regulam a estabilidade genômica, HDACs tem como alvo, reguladores oncogênicos, como a Hsp90, que são importantes para o desenvolvimento câncer (Kovacs J.J. et al.,2005; Bali P. et al., 2005).

O recrutamento de HDAC por DNA metiltransferase e por proteínas específicas ligantes de metil diminuem a transcrição induzindo uma repressão da

cromatina (Robertson K.D. et al.,2000).

INIBIDORES DE DEACETILASES DE HISTONA (HDI): NOVA PERSPECTIVA TERAPÊUTICA.

A identificação de biomarcadores específicos para maximizar terapias é uma área emergente (Stimson L., La Thangue N.B., 2009). Inicialmente desenvolvidos como agentes anti-câncer, os inibidores de HDAC (HDI) são chamados de moduladores epigenéticos. Muitos alvos biológicos de HDAC mostraram que estão envolvidos em diversas vias biológicas conduzindo ao câncer e outras doenças (Bertrand P., 2010).

Duas das principais razões pelas quais HDIs podem desempenhar papel chave são:

- 1- Sua habilidade de melhorar a eficácia de citostáticos (como ácido retinóico) e,
- 2- Terem como alvo, genes de transcrição causadores específicos de doença (Garea-Villar A. & Steller M.,2004; Kelly W.K. et al., 2002).

HDIs são classificados em seis grupos, ácidos graxos de cadeia curta, ácidos hidroxâmicos, peptídeos cíclicos, benzamidas, cetonas eletrofílicas e moléculas híbridas (Drummond D.C. et al., 2005).

A combinação destes agentes com a terapia citotóxica está em progressão, pois o tratamento com HDI oferecerá melhoria no acesso dos agentes citotóxicos ao DNA alvo/complexo proteico (Marchion D.C. et al., 2004).

O grupo de cadeia curta de ácidos graxos (butirato, fenilbutirato e ácido valpróico) tornou-se uma preferência em pesquisas em câncer, em consideração por serem produzidos na fermentação bacteriana e encontrados em fibras alimentares

(Vannini A. et al., 2004). Porém, na aplicação clínica, este grupo tem seu uso limitado devido à sua alta concentração efetivo em milimolar quando avaliados em células (Hu E. et al.,2003). Em concentrações micromolar, são mais estáveis, sendo capazes de aumentar a acetilação mesmo após 48h. Curiosamente, o uso de ácido suberoilânico hidroxâmico (SAHA) tem sido bem sucedido em estudos de fase II para a tratamento do linfoma cutâneo de células T (Duvic M. et al.,2007) e é o primeiro HDI aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para entrar no mercado de oncologia clínica.

Os compostos desta classe são facilmente metabolizados *in vivo* e apresentam meia-vida no plasma menor que a de moléculas em outras classes de HDIs (Tischler JL et al., 2008). Enquanto, butirato sódico, efetivamente, induz apoptose em linfoma e leucemia (Filippovich, I. et al., 1994; Calabresse, C. et al, 1993) inibição no crescimento celular em linhagens de câncer de cólon (Hague, A. et al., 1993; Heerdt, B. G. et al., 1994). Mas, ele também pode ter efeito proliferativo ou protetor em outros tipos celulares, como células normais de criptas intestinais (Bartra, H. P. et al, 1993; Sakata, T. 1987; Tutton, R. J. & Barkla, D. H. 1982; Scheppach, W. et al., 1995) ou neutrófilos (Stringer, R. E . et al., 1996). Os mecanismos propostos para um possível efeito de butirato sódico nas células devem-se a alteração na expressão gênica - incluindo aqueles genes importantes no crescimento celular, divisão celular e proliferação (Scheppach, W. et al.,1995; Sealy, L. and Chalkey, R., 1978; Candido, E. P. M. et al., 1978; Boffa, L. C. et al.,1978; . Kruh, J. et al., 1994; . Foss, F. M. et al., 1989) - elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} (Orrenius, S. & Nicotera, P. 1994) e AMPc. A concentração de cálcio livre no citoplasma é controlada por um amplo número de fatores, incluindo canais/transportadores de Ca^{2+} na membrana plasmática e nas organelas celulares

que usam locais de armazenamento de Ca^{2+} . Canais de Ca^{2+} podem ser ativados por diversos eventos, incluindo despolarização da membrana, fosforilação, cinases dependentes de AMPc e proteínas G-acopladas. A regulação dos níveis de Ca^{2+} intracelular não ocorre em uma única via e frequentemente, estes elementos regulatórios estabelecem comunicação por diversas vias. Vários grupos de pesquisa tem demonstrado a super expressão de AMPc em vários tipos celulares, incluindo neuroblastoma. Contudo o efeito de butirato de sódio na viabilidade celular varia de célula para outra (Scheppach, W. et al., 1995; Bartra, H. P. et al., 1993).

Uma compreensão mais detalhada da base molecular por trás de sua atividade antitumoral é crucial. Estudos translacionais são necessários para correlacionar acetilação das histonas, a transcrição gênica e a resposta do tumor, bem como os mecanismos não epigenéticos, incluindo a indução de espécies reativas de oxigênio, acetilação de proteínas de choque térmico 90(HSP90), e o fator de necrose tumoral relacionado pela indução de receptores de ligação a apoptose e a sinalização pelo fator nuclear kappa- β (Rosato RR, et al., 2005).

Os HDIs, como fenilbutirato, TSA e SAHA induzem expressão do gene CDKN1A, o qual codifica um inibidor da ciclina dependente de cinase (CDK), p21^{WAF1} (Saito A. et al., 1999; Vrana J.A. et al., 1999). A indução de p21^{WAF1} e a baixa regulação de ciclina A correlacionam-se com a diminuição da atividade CDK2 e parada do ciclo celular. A indução da expressão de p21^{WAF1} é desempenhada através de um importante, se não, determinante papel na parada de crescimento celular em G1. Células clonadas sem a expressão de p21 não pararam em G1, mas continuaram a síntese de DNA e foram paradas na fase G2/M (Sandor V. et al., 2000).

O principal processo através do qual HDIs provoca citotoxicidade celular é a

apoptose (morte celular programada). A apoptose pode ocorrer através das vias extrínsecas (receptores de morte) ou intrínsecas (caracterizada pela liberação de citocromo C pela mitocôndria) (Xu W.S. et al., 2007). Curiosamente, o potente fator de transcrição pró-apoptótica, p53, não parece ser necessário para apoptose induzida por HDI. Em vez disso, proteínas pró-apoptóticas, Bax e BH3 são necessárias para este efeito (Lindemann R.K. et al., 2007; Subramanian C. et al., 2005). Além disso, a super expressão das proteínas antiapoptóticas, Bcl2 ou Bcl_{XL} revoga indução por HDI (Lindemann R.K. et al., 2007). A apoptose induzida por HDI depende também do aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), causada pelo tratamento de HDI. Este fenômeno provavelmente reflete a incapacidade de células tumorais para super expressão de tioredoxina, uma proteína antioxidante, durante acumulação de ROS induzida por HDI (Butler L.M. et al. 2002).

Os HDIs também podem induzir a instabilidade genômica pela alteração de reparação de danos ao DNA (Bhaskara S. et al.,2008) e fazendo com que ocorra uma catástrofe mitótica (desagregação dos cromossomos por causa de defeitos no ponto de checagem no fuso mitótico). Além disso, em condições experimentais de bloqueio de apoptose, HDIs ainda podem induzir morte celular por um processo dependente de autofagia (Shao Y. et al.,2004). Esta última descoberta indica que HDIs podem ser eficazes contra cânceres com defeitos apoptose (Xu W.S. et al., 2007).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do antagonista do receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR), RC-3095, já verificado em linhagens tumorais *in vitro* e *in vivo*, de butirato de sódico (NaB) e da combinação deste antagonista com NaB na proliferação celular de células de neuroblastoma, utilizando-se como modelo a linhagem celular murino Neuro2a.

• Objetivos Específicos

- Padronização do cultivo e determinação da curva de crescimento celular da linhagem celular de neuroblastoma murino, Neuro2a;
- Determinação das curvas de dose e de tempo do antagonista do receptor do peptídeo liberador de gastrina, RC-3095, e do NaB na linhagem celular de neuroblastoma murino, Neuro2a;
- Avaliação da expressão de GRPR na linhagem celular de neuroblastoma murino, Neuro2a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Alexander RW, Upp JR Jr, Poston GJ et al.** Effects of bombesin on growth of human small cell lung carcinoma in vivo. *Cancer Res* 1988; 48: 1439–1441.
- **Anastasi A, Erspamer V, Bucci M.** Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombesina* and *Alytes*. *Experientia* 1971; 27: 166-169.
- **Bagatell R, Beliakoff J, David CL, Marron MT, Whitesell L.** Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin. *Int J Cancer* 2005; 113(2):179-88.
- **Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K.** Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer* 2004; 90 (1): 245–252.
- **Bali P, Pranpat M, Bradner J, et al.** Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 2005;280:26729–34.
- **Bartra HP, Scheppach W, Schmid H, Hofmann A, Dusel G, Richter F, Richter A, Kasper H.** Proliferation of human colonic mucosa as an intermediate biomaker of carcinogenesis: Effects of butyrate, deoxycholate, calcium, ammonia, and pH. *Cancer Res* 1993; 53:3283–3288.
- **Benya RV, Fathi Z, Kusui T, et al.** Gastrin-releasing peptide

receptor-induced internalization, down-regulation, desensitization, and growth: possible role for cyclic AMP. *Mol Pharmacol* 1994; 46:235–245.

- **Beppu K, Jaboine J, Merchant MS, Mackall CL, Thiele CJ.** Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(1):46-55.
- **Bertrand P.** Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010; 45(6): 2095-116
- **Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, et al.** Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol Cell* 2008; 30:61–72.
- **Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A.** Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:1008–16.
- **Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG.** Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* 1978; 253:3364–3363.
- **Bold RJ, Kim HJ, Ishizuka J et al.** A human gastric cell line possesses a functional receptor for gastrin-releasing peptide. *Cancer Invest* 1998; 16: 12–17.
- **Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW.** Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:769–84.
- **Bologna M, Festuccia C, Muzi P et al.** Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 1989; 63: 1714–1720.
- **Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys**

- G, et al.** Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1999; 340(25):1954-61.
- **Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al.** Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 224:1121–4.
 - **Brodeur GM.** Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3:203–16.
 - **Budillon A, Di GE, Bruzzese F, Rocco M, Manzo G, Caraglia M.** Histone deacetylase inhibitors: a new wave of molecular targeted anticancer agents. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2007, 2:119-134.
 - **Burns DM, Walker B, Gray J, Nelson J.** Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24.11 modulates proliferative responses to bombesin. *Br J Cancer* 1999; 79: 214–220.
 - **Butler LM, Zhou X, Xu WS, et al.** The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11700–5.
 - **Calabresse, C., Venturini, L., Ronco, G., Villa, P., Chomienne, C., and Belpomme, D.** Butyric acid and its monosaccharide ester induce apoptosis in the HL-60 cell line. *Biochem. Biophys. Res Comm* 199; 3195:31–38.
 - **Candido EPM, Reeves R, Davie JR.** Sodium butyrate inhibits histone deacetylase in cultured cells. *Cell* 1978;14:105–113.
 - **Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bökkerink J, Egeler M, et al.** Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1996;334(4):225-30.

- **Castel V, Grau E, Noguera R, Martínez F.** Molecular biology of neuroblastoma. *Clin Transl Oncol* 2007; 9(8):478-83.
- **Catalano MG, Poli R, Pugliese M, Fortunati N, Boccuzzi G.** Valproic acid enhances tubulin acetylation and apoptotic activity of paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer* 2007, 14:839-845.
- **Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M, Kramer K, Gollamudi S, Heller G, Gerald W, Yeh S, Finn R, Larson SM, et al.** N7: a novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (NB) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36(1):227-30.
- **Chu KU, Evers BM, Ishizuka J et al.** Role of bombesin on gut mucosal growth. *Ann Surg* 1995; 222: 94–100.
- **Chu KU, Higashide S, Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Thompson JC.** Bombesin stimulates mucosal growth in jejunal and ileal Thiry-Vella fistulas. *Ann Surg* 1995; 221(5):602-9; discussion 609-11
- **Coffey DC, Kutko MC, Glick RD, Butler LM, Heller G, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, La Quaglia MP.** The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res* 2001; 61(9):3591-4.
- **Cornelio D. B., Roesler R. & Schwartzmann G.** Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Annals of Oncology* 2007; 18: 1457–1466.
- **de Farias CB, Stertz L, Lima RC, Kapczinski F, Schwartzmann**

- G, Roesler R.** Reduced NGF secretion by HT-29 human colon cancer cells treated with a GRPR antagonist. *Protein Pept Lett* 2009;16(6):650-2.
- **de Farias CB, Lima RC, Lima LO, Flores DG, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R.** Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* 2008;75(1-2):27-31.
 - **de Oliveira MS, Cechim G, Braganhol E, Santos DG, Meurer L, de Castro CG Jr, Brunetto AL, et al.** Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *J Neurooncol* 2009; 93(2):191-201.
 - **Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS.** Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 2004 Aug 26;430(7003):1034-9.
 - **Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC.** Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:495–528.
 - **Duncan EM, Muratore-Schroeder TL, Cook RG, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, et al.** Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* 2008; 135:284-294.
 - **Duvic M, Talpur R, Ni X, et al.** Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2007; 109(1):31-9.
 - **Ellis L, Pan Y, Smyth GK, George DJ, McCormack C, Williams-Truax R, et al.** Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces clinical

responses with associated alterations in gene expression profiles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14(14):4500–10.

- **Enokida H, Nakagawa M.** Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; 13(4):298–307.
- **Evans AE, Kisselbach KD, Liu X, Eggert A, Ikegaki N, Camoratto AM, Dionne C, Brodeur GM.** Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xenografts expressing TrkB. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36(1):181-4.
- **Evans AE, Kisselbach KD, Yamashiro DJ, Ikegaki N, Camoratto AM, Dionne CA, Brodeur GM.** Antitumor activity of CEP-751 (KT-6587) on human neuroblastoma and medulloblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* 1999; 5(11):3594-602.
- **Filippovich, I., Sorokina, N., Khanna, K. K., and Lavin, M. F.** Butyrate induced apoptosis in lymphoid cells preceded by transient over-expression of hsp70 mRNA. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 198:257–265.
- **Finnin M.S., Donigian J.R., Cohen A., Richon V.M., Rifkind R.A., Marks P.A., Breslow R., Pavletich N.P.** Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999; 401(6749):188-93.
- **Fiskus W, Rao R, Fernandez P, Herger B, Yang Y, Chen J, et al.** Molecular and biologic characterization and drug sensitivity of pan-histone deacetylase inhibitor-resistant acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2008; 112:2896-2905.
- **Fiskus W, Ren Y, Mohapatra A, Bali P, Mandawat A, Rao R, et al.** Hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitors attenuate estrogen receptor-alpha levels and transcriptional activity: a result of

hyperacetylation and inhibition of chaperone function of heat shock protein 90. Clin Cancer Res 2007, 13:4882-4890.

- **Flores DG, Lenz G, Roesler R, Schwartzmann G.** Gastrin-releasing peptide receptor signaling in cancer. Cancer Therapy 2009; 7: 332-346.
- **Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, et al.** Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 Glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. Curr Neurovasc Res 2008;5(2):99-105.
- **Foss FM, Veillette A, Sartor O, Rosen N, Bolen JB.** Alterations in the expression of pp60c-src and p56lck associated with butyrate-induced differentiation of human colon carcinoma cells. Oncogene Res 1989; 5:13–23.
- **Garattini E, Gianni M, Terao M.** Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. Curr Pharm Des 2007; 13(13):1375-400.
- **Garea-Villar A and Steller M.** Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. Int J Cancer 2004;112: 171-178.
- **Gehring M, Berthold F, Edler L, Schwab M, Amler LC.** The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. Cancer Res 1995;55(22):5366-9.
- **Glaser KB.** HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. Biochem Pharmacol 2007; 74:659-671.
- **Glozak MA, Seto E.** Histone deacetylases and cancer. Oncogene 2007;

26:5420–32.

- **Goldsmith KC, Hogarty MD.** Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2005; 228(1-2):133-41.
- **Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, et al.** Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 1999; 18(35):4948-57.
- **Gustafson WC, Berry BB, Evers M, Chung DH.** Role of Gastrointestinal Hormones in Neuroblastoma. *World J Surg* 2005; 29: 281- 286.
- **Hague, A., Manning, A. M., Hanlon, K. A., Huschtscha, L.I., Hart, D., Paraskeva, C.** Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumor cell lines in a p53- independent pathway: Implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Intl. J. Cancer* 1993; 55:498–505.
- **Heerdt, B. G., Houston, M. A., Augenlicht, L. H.** Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1994; 54:3288–3294.
- **Hicks MJ & Mackay B.** Comparison of ultrastructural features among neuroblastic tumors: maturation from neuroblastoma to ganglioneuroma. *Ultrastructural Pathology* 1995;19:311–22.
- **Ho R, Minturn JE, Hishiki T, Zhao H, Wang Q, Cnaan A, Maris J, Evans AE, Brodeur GM.** Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2005; 65(21):9868-75.
- **Hoshino I & Matsubara H.** Recent Advances in Histone Deacetylase Targeted. *Cancer Therapy Surg Today* (2010) 40:809–815.

- **Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Liu R, et al.** Identification of novel isoformselective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307:720–728.
- **Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim CJ, et al.**, MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Res* 2002; 62(21):6108-15.
- **Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV.** International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 2008; 60(1):1-42.
- **Jungwirth A, Galvan G, Pinski J et al.** Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix (SB-75) and bombesin antagonist RC-3940-II inhibit the growth of androgen-independent PC-3 prostate cancer in nude mice. *Prostate* 1997; 32 (3): 164–172.
- **Kahan Z, Sun B, Schally AV et al.** Inhibition of growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast carcinoma by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II. *Cancer* 2000; 88 (6): 1384–1392
- **Kanao K, Mikami S, Mizuno R, Shinojima T, Murai M, Oya M.** Decreased acetylation of histone H3 in renal cell carcinoma: a potential target of histone deacetylase inhibitors. *J Urol* 2008; 180(3):1131–6.
- **Katzenstein HM, Bowman LC, Brodeur GM, Thorner PS, Joshi VV, Smith EI, Look AT, Rowe ST, Nash MB, et al.** Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and

histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric oncology group experience- a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol* 1998;16(6):2007-17.

- **Kelly WK, O'Connor OA and Marks PA.** Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Exp Opin Investig Drugs* 2002; 11: 1695-1713.
- **Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, et al.** Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem. J.* 2008; 409(2):581-9.
- **Kim HJ, Evers BM, Guo Y et al.** Bombesin-mediated AP-1 activation in a human gastric cancer (SIIA). *Surgery* 1996; 120: 130–136.
- **Kim S, Hu W, Kelly DR, et al.** Gastrin-releasing peptide is a growth factor for human neuroblastomas. *Ann Surg* 2002; 235:621–629
- **Kogner P, Barbany G, Dominici C, et al.** Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 1993; **53**: 2044–50.
- **Kouraklis G & Theocharis S.** Histone deacetylase inhibitors: A novel target of anticancer therapy. *Oncology Reports* 2006; 15:489-494.
- **Kouraklis G & Theocharis S.** Histone deacetylase inhibitors and anticancer therapy. *Curr Med Chem - Anti-cancer Agents* 2002; 2: 477-484.
- **Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, et al.** HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor.

Mol Cell 2005; 18:601–7.

- **Kruh J, Tichonicky L, Defer N.** Effect of butyrate on gene expression. Page 147, in Binder HJ, Cummings JH, and Soergel K., (eds.), Short Chain Fatty Acids. 1994. Vol. 135, Kluwer Academic press, Dordrecht.
- **Kushner BH, Gilbert F, Helson L.** Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. Cancer. 1986; 57(9):1887-93.
- **Längler A, Christaras A, Abshagen K, Krauth K, Hero B, Berthold F.** Topotecan in the treatment of refractory neuroblastoma and other malignant tumors in childhood - a phase-II-study. Klin Padiatr. 2002 Jul-Aug; 214(4):153-6.
- **Lin RJ, Sternsdorf T, Tini M, Evans RM.** Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. Oncogene 2001; 20:7204–15.
- **Lindemann RK, Newbold A, Whitecross KF, et al.** Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:8071–6.
- **Logothetis C, Hoosein N.** The inhibition of the paracrine progression of prostate cancer as an approach to early therapy of prostatic carcinoma. J Cell Biochem Suppl 1992; 16H: 128–134.
- **London WB, Frantz CN, Campbell LA, Seeger RC, Brumback BA, et al.** Phase II randomized comparison of topotecan plus cyclophosphamide versus topotecan alone in children with recurrent or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. Clin Oncol 2010;

28(24):3808-15.

- **Look AT, Hayes FA, Nitschke R, et al.** Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine* 1984;311:231–5.
- **Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, et al.** Sequence-specific potentiation of topoisomerase II inhibitors by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *J Cell Biochem* 2004; 92:223-237.
- **Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL.** Neuroblastoma. *Lancet* 2007; 369(9579):2106-20.
- **Maris JM, Matthay KK.** Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(7):2264-79.
- **Maris JM, Weiss MJ, Guo C, Gerbing RB, Stram DO, White PS, Hogarty MD, et al.** Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000; 18(9):1888-99.
- **Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, Hogarty MD, et al.** Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res* 2002; 62(22):6651-8.
- **Maris, JM, & Tonini, GP.** Genetics of familial neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA, eds. *Neuroblastoma*. Amsterdam: Elsevier Science, 2000: 125-36.

- **Marmorstein R.** Structure of histone deacetylases: review insights into substrate recognition and catalysis. *Structure* 2001; 9(12):1127-33.
- **Martínez A, Zudaire E, Julián M, Moody TW, Cuttitta F.** Gastrin-releasing peptide (GRP) induces angiogenesis and the specific GRP blocker 77427 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 2005; 24(25):4106-13.
- **Martinsson T, Sjöberg RM, Hedborg F, Kogner P.** Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res* 1995; 55(23):5681-6.
- **McDonald TJ, Jörnvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V.** Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90(1):227-33.
- **Minucci S., Pelicci G..** Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:38-51.
- **Nakagawara A, Arima M, Azar CG, et al.** Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res* 1992; 52: 1364–68.
- **Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, et al.** Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 1993; 328: 847–54.
- **Nakagawara A.** Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer

and neural development. *Cancer Lett* 2001; 169(2):107-14.

- **Nakagawara A., Azar C. G., N J Scavarda, and G M Brodeur.** Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994; 14(1): 759–767.
- **Narayan S, Guo YS, Townsend CM Jr et al.** Specific binding and growth effects of bombesin-related peptides on mouse colon cancer cells in vitro. *Cancer Res* 1990; 50: 6772–6778
- **Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Perez C, et al.** Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000; 18(3):477-86.
- **Nilsson JA, Keller UB, Baudino TA, Yang C, et al.** Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. *Cancer Cell* 2005; 7(5):433-44.
- **Norris MD, Bordow SB, Haber PS, Marshall GM, Kavallaris M, et al.** Evidence that the MYCN oncogene regulates MRP gene expression in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997; 33(12):1911-6.
- **Ocker M & Schneider-Stock R.** Histone deacetylase inhibitors: signaling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(7-8):1367-74.
- **Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, Brenol JC, Petronilho F, Roesler R, Dal-Pizzol F, Schwartzmann G, Xavier RM.** Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides* 2008; 29(10):1726-31.
- **Orrenius S. & Nicotera P.** The calcium ion and cell death. *J Neural*

Transm Suppl 1994; 43:1–11.

- **Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM Jr et al.** Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* 1994; 9: 83–90.
- **Park JR, Stewart CF, London WB, et al.** A topotecan-containing induction regimen for treatment of high risk neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2006; 24 (Suppl 18): A-9013, 505s.
- **Patel KV, Screy MP.** Activation of inositol phospholipids signaling and Ca^{+2} efflux in human breast cancer cells by bombesin. *Cancer Res* 1990; 50: 235–239.
- **Patel O, Dumesny C, Giraud AS, Baldwin GS, Shulkes A.** Stimulation of proliferation and migration of a colorectal cancer cell line by amidated and glycine-extended gastrin-releasing peptide via the same receptor, *Biochem. Pharmacol* 2004; 68: 2129–2142.
- **Paul P, Gillory LA, Kang J, Qiao J, Chung DH.** Targeting gastrin-releasing peptide as a new approach to treat aggressive refractory neuroblastomas. *Surgery*. Epub ahead of print.
- **Perona R.** Cell signaling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol* 2006; 8 (2): 77–82.
- **Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, et al.** Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in Ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 2003; 98:2274–81.
- **Plonowski A, Schally AV, Varga JL et al.** Potentiation of the inhibitory effect of growth hormone-releasing hormone antagonists on PC-3 human

prostate cancer by bombesin antagonists indicative of interference with both IGF and EGF pathways. *Prostate* 2000; 44 (2): 172–180.

- **Porcu M., Chiarugi A.** The emerging therapeutic potential of sirtuin interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26(2):94-103
- **Qu X, Xiao D, Weber HC.** Human gastrin-releasing peptide receptor mediates sustained CREB phosphorylation and transactivation in HuTu 80 duodenal cancer cells. *FEBS Lett* 2002; 527: 109–113.
- **Rajpal S, Venuk AP.** Targeted therapy in colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006; 4 (2): 124–132.
- **Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, et al.** DNMT1 forms a complex with rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000; 25:338-342.
- **Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G.** Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25 (5): 241–242; author reply 242–243.
- **Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G.** Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006a; 5(2):197-204.
- **Roesler R, Luft T, Oliveira SH, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, Dal Pizzol F, Schröder N, Izquierdo I, Schwartzmann G.** Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology.* 2006b; 51(2):350-7.
- **Rosato RR, Grant S.** Histone deacetylase inhibitors: insights into

mechanisms of lethality. *Expert Opin Ther Targets*. 2005; 9(4):809-24.

- **Rozengurt E & Sinnott-Smith J.** Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(10):2936-40.
- **Rozengurt E.** Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13: 128–134.
- **Rozengurt E.** Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists, *J Cell Physiol* 1998; 177: 507–517.
- **Saito A, Yamashita T, Mariko Y, et al.** A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked *in vivo* antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4592-4597.
- **Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, Sackett D, Sausville E, Blagosklonny MV and Bates SE.** P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer* 2000; 83: 817-825.
- **Sakata, T.** Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: A possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br J Nutr* 1987; 58z; 95–103.
- **Saylors RL, Stine KC, Sullivan J, Kepner JL, Wall DA, Bernstein ML, et al.** Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. *Pediatric Oncology Group*. *J Clin Oncol* 2001; 19(15):3463-9.
- **Scheppach W, Bartram P, Richter A.** Role of short-chain fatty acids in

the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31:1077–1080.

- **Schwab M, Praml C, Amler LC.** Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 16: 211–29.
- **Schwab M, Westermann F, Hero B, and Berthold F.** Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003; 4(8):472-80.
- **Schwab M, Toninin GP, Benard J.** Human Neuroblastoma: Recent Advances in Clinical and Genetic Analysis. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993; 11-23.
- **Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M et al.** A phase I trial of the bombesin/ gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 2006; 24 (5): 403–412.
- **Sealy L. & Chalkey R.** The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* 1978; 14:115–121.
- **Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X.** Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:18030–5.
- **Shohet JM, Hicks MJ, Plon SE, Burlingame SM, Stuart S, et al.** Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma. *Cancer Res* 2002; 62(4):1123-8.
- **Shojaei-Brosseau T, Chompret A, Abel A, de Vathaire F, Raquin**

- MA, Brugières L, et al.** Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 42(1):99-105.
- **Shusterman S, Maris M J.** Prospects for therapeutic inhibition of neuroblastoma angiogenesis. *Cancer Lett* 2005; 228(1-2):171-9.
 - **Sebesta JA, Young A, Bullock J et al.** Gastrin-releasing peptide: a potential growth factor expressed in human neuroblastoma tumors. *Curr Surg* 2001; 58 (1): 86–89.
 - **Sidell N.** Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1982; 68(4):589-96.
 - **Simms-Waldrip T, Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, Fu C, Sakamoto KM.** The aggresome pathway as a target for therapy in hematologic malignancies. *Mol Genet Metab* 2008, 94:283-286.
 - **Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F.** Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1):52-8.
 - **Spitz R, Hero B, Westermann F, Ernestus K, Schwab M, Berthold F.** Fluorescence in situ hybridization analyses of chromosome band 1p36 in neuroblastoma detect two classes of alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34(3):299-305.
 - **Stangelberger A, Schally AV, Varga JL et al.** Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone-releasing hormone on

orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (1): 49–57.

- **Stimson L, La Thangue NB.** Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 2009; 280(2):177-83.
- **Strietholt S, Maurer B, Peters MA, Pap T, Gay S.** Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(5):219.
- **Stringer RE, Hart C A, Edwards SW.** Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: Role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br J Haemat* 1996; 92:169–175.
- **Subramanian C, Opipari AW Jr, Bian X, Castle VP, Kwok RP.** Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:4842–7.
- **Suzuki E, Bogenmann H, Shimada H, et al.** Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 377–84.
- **Szepeshazi K, Halmos G, Schally AV et al.** Growth inhibition of experimental pancreatic cancers and sustained reduction in epidermal growth factor receptors during therapy with hormonal peptide analogs. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125 (8–9): 444–452.
- **Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, et al.** TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2004; 6(4):347-60.
- **Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W.** Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 2008; 133:612–26.

- **Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ.** Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000; 6(5):529-35.
- **Tischler JL, Abuaita B, Cuthpert SC, Fage C, Murphy K, Saxe A, Furr EB, Hedrick J, Meyers J, Snare D, Zand AR.** Simple inhibitors of histone deacetylase activity that combine features of short-chain fatty acid and hydroxamic acid inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2008; 23(4):549-55.
- **Tutton, R. J. and Barkla, D. H.** Further studies on the effect of adenosine cyclic monophosphate derivatives on cell proliferation in the jejunal crypts of rat. *Clin. Exp Pharm Physiol* 1982; 9:671–674.
- **Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, et al.** Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15064–15069.
- **Vassal G, Doz F, Frappaz D, Imadalou K, Sicard E, Santos A, O'Quigley J, et al.** A phase I study of irinotecan as a 3-week schedule in children with refractory or recurrent solid tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21(20):3844-52.
- **Vertuani S, De Geer A, Levitsky V, et al.** Retinoids act as multistep modulators of the major histocompatibility class I presentation pathway and sensitize neuroblastomas to cytotoxic lymphocytes. *Cancer Research* 2003; 63(22):8006-13.
- **Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, et al.** Induction of apoptosis in U937

human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-jun, and p21 CIP1, but independent to p53. *Oncogene* 1999; 18: 7016-7025.

- **Wagner LM, Crews KR, Iacono LC, Houghton PJ, Fuller CE, et al.** Phase I trial of temozolomide and protracted irinotecan in pediatric patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 2004; 10(3):840-8.
- **Walkinshaw DR & Yang XJ.** Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics. *Curr Oncol* 2008; 15(5): 237–243.
- **White PS, Maris JM, Beltinger C, Sulman E, Marshall HN, Fujimori M, et al.** A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(12):5520-4.
- **White PS, Thompson PM, Seifried BA, Sulman EP, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, et al.** Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36(1):37-41.
- **White PS, Thompson PM, Gotoh T, Okawa ER, Igarashi J, Kok M, et al.** Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 2005; 24(16):2684-94.
- **Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA.** Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007; 26:5541–52.
- **Yamashiro DJ, Liu XG, Lee CP, et al.** Expression and function of Trk-C in favourable human neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1997; 33: 2054–57.
- **Yang ZF, Ho DW, Lam CT, Luk JM, Lum CT, Yu WC, Poon RT, Fan ST.**

Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(1):219-25.

- **Zheng YG, Wu J, Chen Z, Goodman M.** Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy. *Med Res Rev* 2008; 28:645-687.

ARTIGO CIENTÍFICO

Cell Biology International

A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastoma cell growth: prevention by a histone deacetylase inhibitor

Ana Lucia Abujamra a,b,1, Viviane R. Almeida a,1, Algemir L. Brunetto a,b, Gilberto Schwartzmann a,c, Rafael Roesler a,d,*

Ana Lucia Abujamra

a Cancer Research Laboratory, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

b Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Viviane Rösner de Almeida

a Cancer Research Laboratory, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Algemir Lunardi Brunetto

a Cancer Research Laboratory, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto

Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

b Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Gilberto Schwartzmann

a Cancer Research Laboratory, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

c Department of Internal Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Rafael Roesler

a Cancer Research Laboratory, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

d Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil

¹ Ana Lucia Abujamra and Viviane R. Almeida contributed equally to this article.

*** Corresponding author at:**

Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS/Campus Centro/UFRGS), 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil; Tel.: +55 51 3308 3183; fax: +55 51 3308 3183.

E-mail address: rroesler@terra.com.br (R. Roesler)

Abstract

Gastrin-releasing peptide (GRP) acts as an autocrine growth factor for neuroblastoma and other types of cancer, and its cell-surface receptor, GRPR, is overexpressed in advanced-stage human neuroblastoma. GRPR knockdown and GRPR antagonism inhibit the growth of experimental neuroblastoma. Here we show that a GRPR antagonists promotes rather than inhibits the growth of neuroblastoma cells. The GRPR antagonist, RC- 3095, at 0.1 nM inhibited, whereas at 100 nM stimulated proliferation of Neuro2a murine neuroblastoma cells *in vitro*. The stimulatory effects were prevented by the histone deacetylase inhibitor (HDACi), sodium butyrate (NaB). Expression of GRPR mRNA in Neuro2a cells was analyzed by RT-PCR. These findings provide evidence that a GRPR antagonist can stimulate the growth of cancer cells, and suggest that GRPR might interact with epigenetic mechanisms in regulating neuroblastoma cell growth.

Keywords: RC-3095; Gastrin-releasing peptide receptor; Sodium butyrate; Histone deacetylase inhibitors; Epigenetic mechanisms; Neuroblastoma

1. Introduction

Neuroblastoma, a neoplasm of the sympathetic nervous system, is the most frequently occurring extracranial solid tumor in children. It accounts for 9- 10% of pediatric tumors and remains highly lethal in spite of aggressive treatment, with

mortality rates exceeding 50% (Castel et al., 2007; Maris et al., 2007; Park et al., 2008).

The development of new molecularly targeted therapeutic strategies is thus urgently needed (Sartelet et al., 2008; Tonini and Pistoia, 2006).

Gastrin-releasing peptide (GRP) a mammalian bombesin-like peptide, has emerged as a major autocrine growth factor involved in the development of a variety of human cancers, including neuroblastoma (reviewed in Cornelio et al., 2007; Patel et al., 2006). The GRP receptor (GRPR), a member of the G-coupled family of cell surface receptors, is overexpressed in advanced-stage human neuroblastoma, and GRP is secreted by neuroblastoma cells (Kim et al., 2002). GRPR activation by GRP or bombesin stimulate neuroblastoma growth (Ishola et al., 2007; Kang et al., 2007; Kim et al., 2002; Qiao et al., 2006), whereas GRPR antagonists prevent the stimulatory effects of GRP and bombesin (Ishola et al., 2007; Kang et al., 2007). In addition, GRPR knockdown in BE(2)-C neuroblastoma cells reduced cell size and proliferation (Qiao et al., 2008). This evidence strongly supports the view that the GRPR is a promising therapeutic target, and GRPR antagonists could be potentially useful in the clinic for treating neuroblastoma (Kang et al., 2007; Kim et al., 2002; Qiao et al., 2006; 2008). RC-3095, a GRPR antagonist developed by Schally and colleagues as an experimental anticancer agent (Radulovic et al., 1991), inhibits cell proliferation and tumor growth in many types of experimental cancer (reviewed in Cornelio et al., 2007; Schally et al., 2001). In experimental neuroblastoma, RC-3095 prevented the stimulatory effect of bombesin on the growth of human neuroblastoma xenografts (Kang et al., 2007).

We now report that treatment with low and high doses of RC-3095 induced opposite effects on proliferation of cultured Neuro2a mouse neuroblastoma cells, with

the highest dose enhancing viability and proliferation. Because GRPR antagonists have been shown to interact with histone deacetylase inhibitors (HDACis) in inhibiting the proliferation of lung cancer cells (Moody et al., 2006), the effects of the HDACi sodium butyrate (NaB) on cell viability in Neuro2a cells treated or not with RC-3095 were also examined. Treatment with NaB alone or combined with RC-3095 decreased proliferation and viability of Neuro2a cells. These findings shows that GRPR antagonists can stimulate, rather than inhibit, cancer cell growth. In addition, NaB inhibited proliferation of Neuro2a cells suggesting that the stimulatory effects of RC-3095 on neuroblastoma cell growth might depend on interactions with epigenetic mechanisms such as HDAC activity.

2. Materials and methods

2.1. Cell line and cell culture

Neuro2a, neuroblastoma cells obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) were maintained in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Carlsbad, USA) containing 0.1% Fungizone and 100 U/l gentamicin supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sorali) at 37 °C in a humidified incubator under 5% CO₂. All experimental procedures were approved by The Institutional Research Ethics Committee.

2.2. Drugs and chemicals

The HDACi NaB (Sigma-Aldrich) was prepared at a stock concentration of 100mM in deionized-distilled water and sterilized by filtering through a 0.22 µm syringe filter before storage at -20°C. 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) was prepared as a 10X stock (5 mg/ml) before storage at -20°C. The GRPR antagonist RC-3095 was a obtained from

AEterna Zentaris GmbH. Stock solutions at 1mM were prepared in deionized-distilled water and sterilized by filtering through a 0.22 µm syringe filter before storage at 20°C. The concentrations of RC-3095 and NaB were based on previous studies showing inhibitory effects of those drugs on proliferation of cancer cell lines *in vitro* (De los Santos et al., 2007; dos Santos et al., 2008; Flores et al., 2008; Pinski et al., 1994).

2.3. Reverse transcriptase polimerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from cells using Trizol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions and eluted in 30 µl DEPC-treated water (diethyl pyrocarbonate, Invitrogen, São Paulo, Brazil). RNA was reverse-transcribed using the Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Briefly, 1 µg RNA was added to 1 µL 10 mM dNTP, 1 µL 50uM oligo (dT)20 and DEPC-treated water at a 10 µL final volume. After 5 min incubation at 65°C, 10 µl buffer containing 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, 1 µL RNaseOUT™, and 1 µL SuperScript III RT™ was added to each sample, which was then incubated at 50°C for 50 min followed by a 5-min incubation at 85°C. Two microliters of cDNA was amplified with GRPR-specific primers (Forward primer: 5'CAAGATCTTCTGCACGGTCA3' Reverse primer: 5'TCAGTTTGCAGCCAATTCTG3') or beta-actin primers (Forward primer: 5'AAACTGGAACGGTGAAGGTG3' Reverse primer: 5'AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT3') in a 20 µl reaction mixture containing 1 X buffer, 0.2 µM primers, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, and 0.25 U Platinum *Taq* DNA Polymerase, for 30 cycles (94°C for 1 min, 58°C for 30 sec, 72°C for 30 sec) after a 5-min denaturation period (94°C), with a final elongation of 5 min at 72°C. PCR products were visualized in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.4. Cell proliferation assay

Cells were seeded at 5×10^4 cells/well in 24-well plates and treated 24 h afterwards with RC-3095 (0.1, 1, 10, or 100 nM), NaB (1mM), or a combination of RC-3095 and NaB. Forty-eight hours later, the medium was removed and cells were washed twice with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen). Cells were detached with 0.25% trypsin/EDTA (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 10 μ l of cellular suspension was homogenized 1:1 with 0.4% trypan blue solution (Sigma-Aldrich). Cells were counted immediately in a hemocytometer.

2.5. Cell viability assay

Cells were seeded at 6×10^3 cells/well in 96-well plates and treated 24 h afterwards with RC-3095 (0.1 or 100 nM), NaB (1 mM), or both. Forty-eight hours later, the medium was removed and replaced with 1 X MTT diluted in cell medium. The plates were further incubated at 37°C under 5% CO₂ in air for 4h, at which point the MTT solution was removed and replaced with 50 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). The absorbance value of each well was determined using a microplate enzyme-linked immunoassay reader (ELISA) equipped with a 492 nm filter. A negative control well was used to achieve the baseline zero absorbance. The viability was determined as the percentage absorbance of treated cultures compared with those of untreated control cultures.

2.6. Statistics

Results are representative of 3 independent experiments performed in triplicates, and are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of independent experiments. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post-hoc test, using the SPSS program, version 12.0. Values of $P < 0.05$ were considered significantly different.

3. Results

3.1. RC-3095 stimulates and NaB inhibits proliferation of Neuro2a cells assessed by trypan blue cell counting

The effects of various concentrations of RC-3095 on proliferation of Neuro2a neuroblastoma cells *in vitro* are shown in Fig. 1. RC-3095 at 0.1 nM decreased, whereas the concentration of 100 nM stimulated cell proliferation, as determined by trypan blue cell counting 48 h after drug exposure ($P = 0.02$ and $P < 0.0001$ compared to control cells, respectively). Treatment with NaB alone or combined with RC-3095 produced a significant inhibition of cell proliferation (all P s < 0.0001 compared with control cells).

Fig. 1 should be inserted here

3.2. RC-3095 stimulates and NaB inhibits viability of Neuro2a cells assessed by the MTT assay

To examine the effects of RC-3095 and NaB on Neuro2a cell proliferation, cell viability was assessed with the MTT assay (Fig. 2). Consistent with the results obtained using cell counting, RC-3095 at 100 nM produced a significant increase in cell viability ($P = 0.001$ compared to control cells), whereas, in contrast to the result obtained with cell counting, the dose of 0.1 nM had no effect ($P = 0.91$ compared to control cells). Either NaB alone ($P = 0.02$ compared to control cells) or combined with RC-3095 at either 0.1 ($P = 0.02$ compared to control cells) or 100 nM ($P < 0.0001$ compared to control cells) induced a significant decrease in cell viability.

Fig. 2 should be inserted here

3.3. RT-PCR detection of GRPR mRNA in Neuro2a cells

RT-PCR analyses demonstrated that Neuro2a cells express mRNA for GRPR. A transcript size of 180 bp, representing a fragment of the GRPR, was identified (Fig.

3).

Fig. 3 should be inserted here

4. Discussion

Previous studies have indicated that GRPR is overexpressed in neuroblastoma and GRP acts as an autocrine growth factor stimulating neuroblastoma growth (Ishola et al., 2007; Kang et al., 2007; Qiao et al., 2006). Conversely, GRPR antagonists have been shown to inhibit the growth of neuroblastoma cells (Ishola et al., 2007). A seminal study using GRPR knockdown has shown that GRPR silencing inhibited proliferation of BE(2) neuroblastoma cells both *in vitro* and *in vivo* (Qiao et al., 2008). These findings provide a consistent body of evidence indicating that the GRPR antagonism might be a promising therapeutic strategy for the treatment of neuroblastoma. RC-3095 is a GRPR antagonist that consistently inhibits proliferation of a variety of cancer cells lines, including glioma, colon, breast, lung, ovarian, pancreatic, and prostate cancer cells (reviewed Cornelio et al., 2007; Schally et al., 2001). In human neuroblastoma xenografts in mice, RC-3095 blocked bombesin-induced tumor growth and angiogenesis (Kang et al., 2007).

Because previous studies have not investigated GRPR expression and GRPR influences on proliferation in Neuro2a cells, we examined the effects of RC-3095 on proliferation and viability of this cell line. GRPR mRNA expression in Neuro2a cells was confirmed with RT-PCR. As expected, RC-3095 inhibited Neuro2a cell proliferation at the concentration of 0.1 nM by cell counting. However, the same dose did not affect viability assessed by the MTT assay. Unexpectedly, the highest concentration of RC-3095 employed (100 nM) produced a consistent increase in the proliferation and viability. To our knowledge the present findings provide the new

evidence that a GRPR antagonist stimulates cell proliferation. Previous studies indicated that low doses of RC-3095 inhibit cancer cell growth, whereas high doses failed to affect cell proliferation (Flores et al., 2008; Pinski et al., 1994). In addition, we have previously observed that low and high doses of RC-3095 can produce opposite effects on brain function when given intracerebrally in rats (Dantas et al., 2006). It has been proposed that high doses of peptidergic GRPR antagonists display partial agonistic activity on the GRPR, thus failing leaving cell proliferation unaffected (Casanueva et al., 1996). Thus, it is possible that the stimulatory effect of RC-3095 on cell proliferation observed in the present study is related to an intrinsic agonist activity of RC-3095 on the GRPR. The possibility raised by the present findings that, at least under certain experimental conditions, RC-3095 increases rather than inhibits neuroblastoma cell proliferation might have implications for the clinical use of GRPR antagonists as anticancer agents, which might be taken into account when choosing doses to be tested in clinical trials of RC-3095 and other GRPR antagonists in patients with neuroblastoma and other types of cancer.

GRPR influences on neuroblastoma growth are mediated by intracellular signaling pathways including the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt cascade and downstream gene transcription factors (Ishola et al., 2007; Qiao et al., 2006). Changes in gene expression triggered by PI3K activation are related to epigenetic mechanisms, including alterations in histone acetylation (Pan et al., 2007). HDAC is such as NaB inhibits the growth of neuroblastoma cells (De los Santos et al., 2007), and the HDACi MS-275 enhances the inhibitory effects of a GRPR antagonist on proliferation of lung cancer cells (Moody et al., 2006). We thus examined the effects of NaB combined with RC-3095 on proliferation and viability of Neuro2a cells. NaB, alone or combined with RC-3095 significantly inhibited cell proliferation, indicating

that NaB and possibly other HDACis can inhibit Neuro2a cell growth and prevent the stimulatory effect of RC-3095 on cell proliferation. This finding raises the possibility that RC-3095-induced cell proliferation is mediated by a mechanism dependent on alterations in epigenetic regulation of gene expression.

5. Conclusions

The results of the present study indicate that low and high doses of a GRPR antagonist, RC-3095, can induce opposite effects on the proliferation of neuroblastoma cells. In addition, the results show that the HDACi NaB inhibits Neuro2a cell proliferation and viability and prevents the enhancing effects of RC-3095. These findings provide the first evidence that a GRPR antagonist can stimulate cancer cell proliferation and might have implications for the potential therapeutic use of GRPR antagonists and HDACis in the treatment of neuroblastoma.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 301578/2006-0 to R.R.; the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil); and the Children's Cancer Institute (ICI-RS; Porto Alegre, Brazil). RC-3095 was a gift from AEterna Zentaris GmbH (Frankfurt, Germany).

References

Castel V, Grau E, Noguera R, Martínez F. Molecular biology of neuroblastoma. *Clin Transl Oncol* 2007;9:478-83.

Casanueva FF, Perez FR, Casabiell X, Camina JP, Cai RZ, Schally AV. Correlation between the effects of bombesin antagonists on cell proliferation and intracellular calcium concentration in Swiss 3T3 and HT-29 cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1406-11.

Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 2007;18:1457-66.

Dantas AS, Luft T, Henriques JA, Schwartzmann G, Roesler R. Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: possible involvement of the GABAergic system. *Peptides* 2006;27:2307-12.

De los Santos M, Zambrano A, Aranda A. Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1425-32.

dos Santos MP, Schwartzmann G, Roesler R, Brunetto AL, Abujamra AL. Sodium butyrate enhances the cytotoxic effect of antineoplastic drugs in human lymphoblastic T-cells. *Leuk Res* 2009 Feb;33(2):218-21. Epub 2008 Aug 9.

Flores DG, Farias CB, Leites J, Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, DiLeone LP, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res* 2008;5:99-105.

Ishola TA, Kang J, Qiao J, Evers BM, Chung DH. Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of gastrin-releasing peptide-induced cell cycle progression in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2007;1770:927-32.

Kang J, Ishola TA, Baregamian N, Morout JN, Rychahou PG, Evers BM, Chung DH. Bombesin induces angiogenesis and neuroblastoma growth. *Cancer Lett* 2007;253:273-81.

Kim S, Hu W, Kelly DR, Hellmich MR, Evers BM, Chung DH. Gastrin-releasing peptide is a growth factor for human neuroblastomas. *Ann Surg* 2002;235:621-9.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369:2106-20.

Moody TW, Nakagawa T, Kang Y, Jakowlew S, Chan D, Jensen RT. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonists increase the ability of histone deacetylase inhibitors to reduce lung cancer proliferation. *J Mol Neurosci* 2006;28:231-8.

Pan L, Lu J, Wang X, Han L, Zhang Y, Han S, Huang B. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A potentiates doxorubicin-induced apoptosis by up-regulating PTEN expression. *Cancer* 2007;109:1676-88.

Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am* 2008;55:97-120.

Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766:23-41.

Pinski J, Schally AV, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K. Somatostatin analogues and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1994;54:5895-901.

Qiao J, Kang J, Ishola TA, Rychahou PG, Evers BM, Chung DH. Gastrin-releasing peptide receptor silencing suppresses the tumorigenesis and metastatic potential of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:12891-6.

Qiao J, Kang J, Ko TC, Evers BM, Chung DH. Inhibition of transforming

growth factorbeta/ Smad signaling by phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Lett* 2006;242: 207-14.

Radulovic S, Cai RZ, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, Schally AV. Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *Int J Pept Protein Res* 1991;38:593-600.

Sartelet H, Oligny LL, Vassal G. AKT pathway in neuroblastoma and its therapeutic implication. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:757-69.

Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, Varga JL, Halmos G. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:248-91.

Tonini GP, Pistoia V. Molecularly guided therapy of neuroblastoma: a review of different approaches. *Curr Pharm Des* 2006;12:2303-17.

Legends for figures

Fig. 1. A high dose of the GRPR antagonist RC-3095 stimulates, whereas a low dose of RC-3095 or the HDACi NaB alone or combined with RC-3095 inhibits, proliferation of Neuro2a neuroblastoma cells assessed by trypan blue cell counting. Data represent the mean + SD number of viable cells 48 h after treatment with RC-3095 (0.1, 1, 10, or 100 nM), NaB (1 mM), or 1 mM NaB combined with RC-3095 at either 10 or 100 nM. Control cells were treated with FBS alone. $n = 3$ experiments performed in triple wells each; * $P = 0.02$ and ** $P < 0.0001$ compared to control cells.

Fig. 2. The GRPR antagonist RC-3095 stimulates, whereas the HDACi NaB alone or combined with RC-3095 inhibits, viability of Neuro2a neuroblastoma cells assessed

by the MTT assay. Data are expressed as mean + SD absorbance 48 h after treatment with RC-3095 (0.1 or 100 nM), NaB (1 mM), or 1 mM NaB combined with RC-3095 at either 0.1 or 100 nM. Control cells were treated with FBS alone. $n = 3$ experiments performed in triple wells each; * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, and *** $P < 0.0001$ compared to control cells.

Fig. 3. RT-PCR analysis of GRPR mRNA expression in Neuro2a neuroblastoma cells. RNA was extracted from Neuro2a cells and RT-PCR analysis was performed. A transcript size of 180 bp, representing a fragment of the GRPR, was identified.

Figure 1

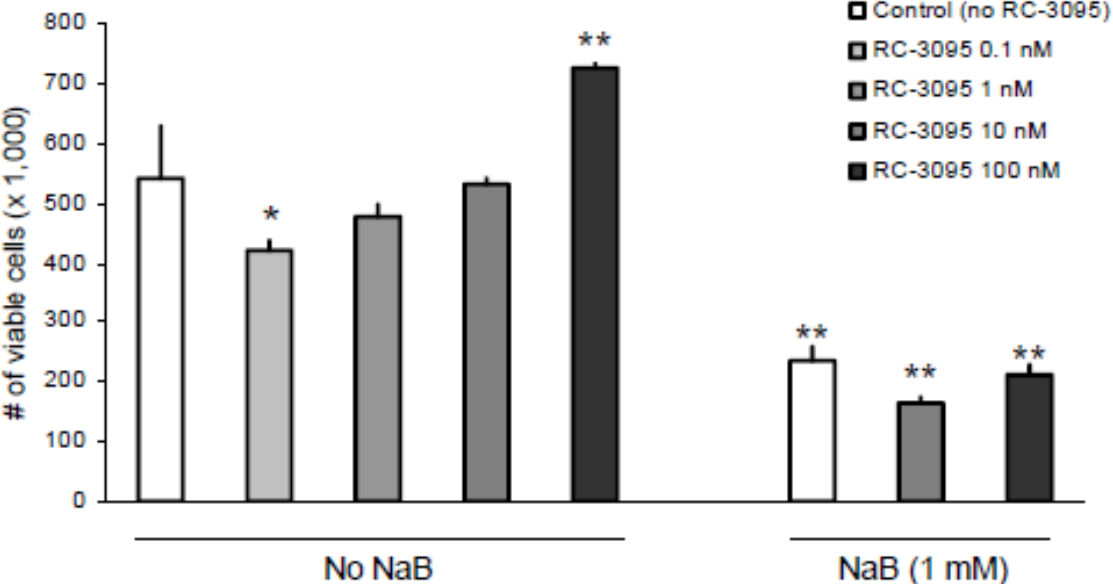


Figure 2

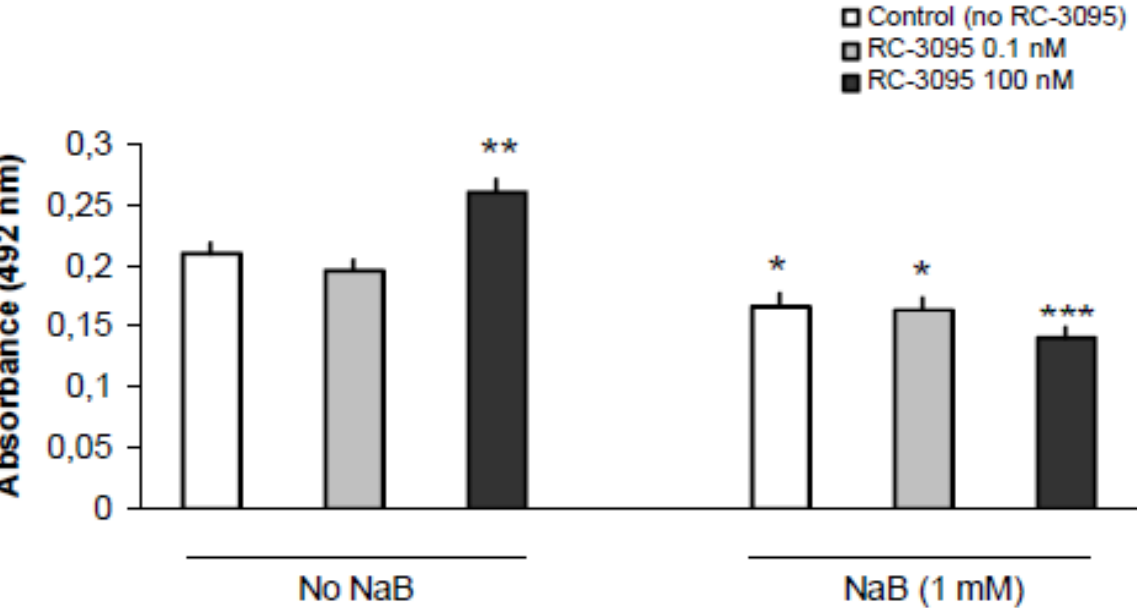
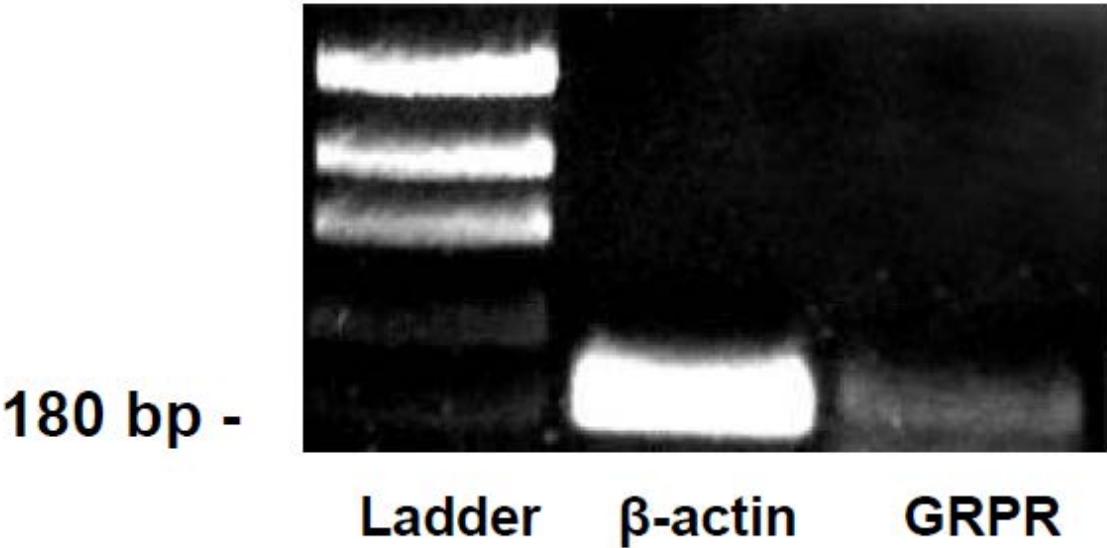


Figura 3



CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este estudo investigou o tratamento de um antagonista do peptídeo liberador de gastrina, RC-3095 sozinho e também associado a uma nova terapia molecular, os inibidores de histonas deacetilases, como NaB. Em estudos anteriores, esses agentes já haviam sido avaliados, porém não a sua combinação em uma linhagem celular de neuroblastoma murino Neuro2a.

Avaliamos a expressão de GRPR através de RT-PCR no crescimento celular desta linhagem Neuro2a.

Realizamos curvas de doses e de tempo para verificar quais seriam inibitórios na proliferação e viabilidade celular. Surpreendentemente, verificamos que a curva de dose de RC-3095, em uma dose menor (0,1nM) teve um efeito inibitório, mas ao aumentarmos as doses, esse efeito não esteve mais presente. A dose mais alta utilizada neste estudo, 100nM, mostrou-nos um efeito estimulatório na proliferação celular. Porém, no ensaio de viabilidade celular a dose 0,1nM não teve efeito.

O RC-3095 em diversas linhagens tumorais tem efeito inibitório, porém, este estudo mostrou pela primeira vez sua atividade estimulatória na proliferação celular a uma dose (100nM). Doses menores tiveram um efeito inibitório no ensaio de proliferação celular, nesta linhagem murino.

Para revertermos esse efeito proliferativo associamos um novo alvo da biologia molecular, os inibidores de histonas deacetilases. Estes têm como alvo a interação entre o DNA e histonas, possibilitando que o DNA fique mais vulnerável a ação da maquinaria transcricional.

Uma curva de dose de NaB(1mM, 2mM e 4mM) mostrou-nos um efeito inibitório a dose de 1mM. Na associação com RC-3095 o efeito estimulatório a

100nM foi revertido.

Novas investigações demonstraram que a curva de dose de RC-3095 teve efeitos opostos na proliferação celular. Verificamos a ação de NaB, nesta linhagem celular murino, ao associarmos com o tratamento o NaB a dose de RC-3095 100nM, mostrando-nos um efeito inibitório na proliferação celular. Este efeito pode ser mediado por um mecanismo dependente de alterações epigenéticas.